

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C23C 18/52		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/48837 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. Dezember 1997 (24.12.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/01236 (22) Internationales Anmeldedatum: 18. Juni 1997 (18.06.97)		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 196 24 332.7 19. Juni 1996 (19.06.96) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: HOFINGER, Jürgen [AT/DE]; Gubener Strasse 28, D-01237 Dresden (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WAHL, Reiner [DE/DE]; Heckenweg 22, D-01257 Dresden (DE). KIRSCH, Remo [DE/DE]; Bernhardstrasse 44, D-01187 Dresden (DE). MERTIG, Michael [DE/DE]; Muldaer Strasse 22, D-01189 Dresden (DE). POMPE, Wolfgang [DE/DE]; Buchenweg 15, D-01737 Kurort Hartha (DE). UNGER, Eberhard [DE/DE]; Otto-Devrient-Strasse 19, D-07743 Jena (DE). (74) Anwälte: UHLEMANN, Henry usw.; Postfach 270 139, D-01171 Dresden (DE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
 (54) Title: METALLIC NANOSTRUCTURE ON THE BASIS OF SELF-ASSEMBLING, GEOMETRICALLY HIGHLY-ORDERED PROTEINS, AND PROCESS FOR PREPARATION THEREOF (54) Bezeichnung: METALLISCHE NANOSTRUKTUR AUF DER BASIS SELBSTASSEMBLIERTER, GEOMETRISCH HOCHGEORDNETER PROTEINE SOWIE VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG (57) Abstract The invention relates to metallic nanostructures on the basis of self-assembled, geometrically highly-ordered proteins, and a process for the preparation thereof. Proteins which, during the process of self-assembly, form highly-ordered two or three-dimensional structures such as bacterial cell coat proteins, collagen, actin filaments and tubulin filaments and DNA strands, are therefore considered to be geometrically highly ordered proteins. According to the invention, the assembled proteins are activated with a metal solution and subsequently are subjected to electroless metal-plating in a metallising bath under conditions tolerable for proteins. The proteins can be partially or fully metal plated. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft metallische Nanostrukturen auf der Basis selbstassemblierter, geometrisch hochgeordneter Proteine sowie ein Verfahren zu deren Herstellung. Unter geometrisch hochgeordneten Proteinen werden dabei Proteine verstanden, die im Prozeß der Selbstassemblierung hochgeordnete zwei- bzw. dreidimensionale Strukturen bilden, wie bakterielle Zellhüllproteine, Kollagen, Actin- und Tubulinfilamente und DNA-Stränge. Erfnungsgemäß werden die assemblierten Proteine mit einer Metalllösung aktiviert und anschließend stromlos in einem Metallisierungsbath unter für Protein verträglichen Bedingungen metallisiert. Die Proteine können teilweise oder vollständig metallisiert sein.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Leitland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

Metallische Nanostruktur auf der Basis selbstassemblierter, geometrisch hochgeordneter Proteine sowie Verfahren zu deren Herstellung

Die Erfindung betrifft metallische Nanostrukturen auf der Basis selbstassemblierter, geometrisch hochgeordneter Proteine sowie ein Verfahren zu deren Herstellung auf der Basis der stromlosen Metallabscheidung auf elektrischen Isolatoren aus der wäßrigen Lösung. Die Voraussetzung bezüglich des Proteins bestehen darin, daß das Protein in einem Selbstassemblierungsprozeß reproduzierbar, geometrisch hochgeordnete Strukturen bildet, die sich durch eine charakteristische Dimension (D) beschreiben lassen. Bei zylindrischen Strukturen bedeutet dies identische Durchmesser und bei zweidimensionalen Proteinstrukturen identische Periodizität des Proteinkristalls.

So gewonnene Strukturen mit charakteristischen Dimensionen im Nanometerbereich weisen neue physikalische Eigenschaften auf und besitzen deshalb ein weites Anwendungsgebiet. Dabei ist nicht nur die Ausnutzung spezifischer elektrischer und magnetischer Eigenschaften wichtig. Die metallischen Nanostrukturen sind als mechanische Bauteile auf dem Gebiet der Mikrosystemtechnik anwendbar. Beispielsweise können derartige Strukturen als Sonden für die Atomkraftmikroskopie, Rastertunnelmikroskopie, Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie und Feldemissions-Transmissionselektronenmikroskopie verwendet werden.

Aus der US-PS 4 911 981 ist ein Verfahren zur Erzeugung von Mikrostrukturen auf der Basis von Lipidstrukturen bekannt. Die Möglichkeit der Erzeugung von Feldemissionsskathoden mit nach diesem Verfahren hergestellten Lipidröhren wird in der US-PS 5 089 742 näher erläutert. Der Nachteil dieser Lipidröhren besteht unter anderem in deren Dimension. Die beschriebenen Phospholipidstrukturen haben einen Außendurchmesser von 500 nm bis 1 µm, was die Herstellung von Strukturen mit kleinerem Durchmesser unmöglich macht. Des Weiteren wird eine starke Streuung der Durchmesser der erzeugten Filamente beobachtet. Das in der US-PS 4 911 981 beschriebene Verfahren beschränkt sich nur auf makromolekulare Lipidstrukturen, die gegenüber der Variation ihrer Umgebungsbedingungen wie z. B. Temperatur und pH-Wert relativ beständig sind. Aus diesem Grunde ist ihre Beschichtung aus der wäßrigen Lösung leicht zu realisieren durch die direkte Anwendung der

für die stromlose Metallisierung von Isolatoren/Plasten entwickelten und bei Brenner, A. und Riddell, G., *Proc. Am. Electroplaters' Soc.*, 34, 156, 1947 oder bei Charles, R.; Shipley, Jr., „*Historical Highlights of electroless plating*“, *Plating and Surface Finishing*, 92-99, 1984 beschriebenen Verfahren. Ganz allgemein wird auf die Möglichkeit der Erzeugung metallischer Nanostrukturen auf der Basis biologischer Objekte in der Arbeit von Douglas, K.; Devaud, G.; Lyon, M.; Clark, N., „*Nanostructure fabrication using biomolecular templates*“, NATO ASI Ser., Ser. C 1183-1191, 1992 eingegangen. In einem deutschen Patent DE 40 38 887 A1 ist ein Verfahren zur Herstellung von Kollagenpartikeln als Wirkstoffträger bekannt. Der Aufbau von Nanostrukturen durch äußere stromlose Metallisierung mit elektrischen oder magnetischen Schichten wird hierbei nicht in Betracht gezogen.

Die Aufgabe der Erfindung besteht deshalb in der Schaffung von Metallstrukturen mit charakteristischen Strukturen im Nanometerbereich.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch eine metallische Nanostruktur gelöst, die aus einem metallisierten, selbstassemblierten, geometrisch hochgeordneten Protein besteht. Dabei kann das Protein teilweise oder vollständig metallisiert sein.

Unter geometrisch hochgeordneten Proteinen werden dabei Proteine verstanden, die im Prozeß der Selbstassemblierung hochgeordnete zwei- bzw. dreidimensionale Strukturen bilden, wie bakterielle Zellhüllproteine, Kollagen, Actin- und Tubulinfilamente und DNA-Stränge (Desoxyribonukleinsäure).

Die erfundungsgemäßen metallischen Nanostrukturen mit vollständiger Metallisierung weisen eine homogene Metallphase auf, in die Keimbildungszentren eines anderen Metalls eingearbeitet sind. Vorzugsweise bestehen dabei die Keimbildungszentren aus Edel- oder Schwermetallen, wie z. B. Gold, Platin, Palladium, Titan oder Zirkonium und die homogene Metallphase aus Nickel oder Kupfer oder Cobalt. Die morphologisch konforme Metallschicht besitzt einer Dicke von 1 nm bis zur charakteristischen Dimension (D) des Proteins. Die Metallschicht ist elektrisch leitend, weist im Fall einer Nickel oder Cobaltbeschichtung magnetische Eigenschaften auf und kann prinzipiell zum weiteren Aufbau von Heterostrukturen (Isolatoren, Halbleiter, Metalle und Keramiken) benutzt werden.

Erfindungsgemäß können die metallischen Nanostrukturen auch nur eine teilweise Metallisierung aufweisen. Die teilweise Metallisierung kann dabei aus einer Metallphase, in die Keimbildungszentren eines anderen Metalls eingearbeitet sind, oder nur aus Keimbildungszentren bestehen. Vorzugsweise bestehen dabei die Keimbildungszentren aus Edel- oder Schwermetallen, wie z. B. Gold, Platin, Palladium, Titan oder Zirkonium und die Metallphase aus Nickel oder Kupfer oder Cobalt.

In einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfundung besteht das selbstassemblierte, geometrisch hochgeordnete Protein aus einer Tubulin enthaltenden Struktur, vorzugsweise Mikrotubuli. Bei Mikrotubuli handelt es sich um eine Filamentstruktur mit einem Außendurchmesser von rund 25 nm und mehreren Mikrometern Länge, die im Cytoskelett von eukaryontischen Zellen vorkommen. Die erfundungsgemäßen metallisierten Mikrotubuli bilden metallische Röhren mit einem Durchmesser von 30 nm bis zu 200 nm, je nachdem wieviel Metall auf den Tubulin enthaltenden Strukturen abgeschieden wird. Auch eine teilweise Beschichtung ist möglich.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfundung besteht das selbstassemblierte, geometrisch hochgeordnete Protein aus bakteriellen Zellhüllenproteinen. Bei bakteriellen Zellhüllenproteinen, auch als S-Layer (surface layer) bezeichnet, handelt es sich um zweidimensionale Proteinkristalle, die bei vielen Bakterien die äußere Zellwandschicht bilden. Diese aus nur einem Protein oder Glycoprotein bestehenden S-layer besitzen die Fähigkeit, *in vitro* in monomolekulare Gitter zu assemblieren. Die Einheitszellengröße der Gitter variiert je nach S-Layer Typ zwischen 10 bis 40 nm, wobei eine Einheitszelle abhängig von der Symmetrie des Gitters (z. B. quadratisch oder hexagonal) aus mehreren Monomeren bestehen kann.

Die erfundungsgemäß verwendeten S-Layer bilden vorzugsweise die Grundlage für eine periodische Anordnung von metallischen Partikeln mit Durchmessern zwischen 0,5 bis 20 nm, je nachdem nach welcher Reaktionsdauer der Prozeß der Metallabscheidung abgebrochen wird. Die periodische Anordnung der metallischen Partikel wird dabei bestimmt durch die

Symmetrie des S-Layers, seine Gitterperiodizität und die Dichte der reaktiven Zentren je Proteinmonomer.

Erfnungsgemäß werden metallische Nanostrukturen auf der Basis selbstassemblierter, geometrisch hochgeordneter Proteine so hergestellt, daß assemblierte, hochgeordnete Proteine mit einer Metalllösung aktiviert und anschließend stromlos in einem Metallisierungsbad unter für Protein verträglichen Bedingungen metallisiert werden. Soll nur eine teilweise Metallisierung realisiert werden, ist die Aktivierung mit einer Metalllösung ausreichend. Möglich ist es aber auch, die aktivierte Proteine begrenzt in einem Metallisierungsbad stromlos zu beschichten.

In einer Ausgestaltung des erfungsgemäßen Verfahrens können die hochgeordneten Proteine *in vitro* zusätzlich assembliert werden. Die erfungsgemäße Aktivierung der Proteine erfolgt mit einer Edelmetall- oder Schwermetalllösung, z. B. mit einer Au-, Pt- oder Pd-Ionen enthaltenden Lösung.

Die stromlose Metallisierung wird nach einer Ausgestaltung der Erfundung mit einem Ni- oder Cu- oder Co-Metallisierungsbad auf der Basis von Dimethylaminoboran als Reduktionsmittel und Ni- oder Cu-, oder Co-Salzen durchgeführt. Vorteilhaft kann auch Hypophosphit als Reduktionsmittel verwandt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfundung werden Mikrotubuli metallisiert. Deren Isolation und Reinigung ist bei *Shelanski, M.; Gaskin, F.; Cantor, C., „Mikrotubule assembly in the absence of added nuclotides“*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 765-768, 1973 und *Vater, W.; Böhm, K.; Unger, E., „Effects of DNA on the taxo stimulated *in vitro* assembly of microtubule protein from porcine brain“*, *Studio Biophys.* 97, 47-60, 1983 ausführlich beschrieben. Die Mikrotubuli werden *in vitro* mit GTP (Guanosin-5'-Triphosphat Trinatriumsalz Monohydrat) und Taxol (aus *Taxus brevifolia*) bei 37 °C assembliert und weitgehend vom nicht assemblierten Protein getrennt.

Die Aktivierung der assemblierten Mikrotubuli erfolgt erfungsgemäß so, daß den assemblierten Mikrotubuli eine gesättigte Pd-Acetatlösung zugesetzt wird und diese Lösung zur Ausbildung von Pd-Keimen auf der Oberfläche der Mikrotubuli führt. Vorteilhaft kann in

diesem Prozeß neben der Adsorption von in der Aktivierungslösung gebildeten Pd-Partikeln an der Oberfläche der Mikrotubuli die Fähigkeit der die Tubulinstruktur bildenden Aminosäurengruppen zur Reduktion von Pd^{2+} zu Pd^0 genutzt werden. Bei diesem Prozeß entstehen auf der Oberfläche der Mikrotubuli Pd-Cluster, deren Größe und Verteilung von der Länge des Aktivierungsprozesses abhängt. Bei einer mittleren Clustergröße von 2 nm ist auch eine Aktivierung der inneren Oberfläche der Mikrotubuli möglich. Vorteilhaft wird der Aktivierungsprozeß für die Dauer von 2 h geführt. Die aktivierten Mikrotubuli werden anschließend von der Aktivierungslösung getrennt, gewaschen und in eine Pufferlösung überführt.

An die Aktivierung schließt sich die eigentliche Metallisierung an. Die gebräuchlichsten Metallisierungsbäder für Kupfer und Nickel arbeiten bei Temperaturen über 60 °C und einem pH-Wert größer 8 (siehe Charles, R.; Shipley, Jr., „*Historical Highlights of electroless plating*“, *Plating and Surface Finishing*, 92-99, 1984 und Lang, K., „*Die stromlose Vernickelung*“, *Galvanotechnik* Nr. 6, 347-358, 1965). Um eine stromlose Beschichtung auf den aktivierte Proteinstrukturen zu realisieren, müssen aber die Beschichtungsbedingungen an die sehr empfindlichen Assemblierungsbedingungen der Proteinstrukturen angepaßt werden, damit während der Metallisierung das biomolekulare Templat nicht zerfällt bzw. dessen Morphologie nicht wesentlich gestört wird.

Die *in vitro* vorliegenden aktivierte Mikrotubuli werden mit einem Ni-Bad auf der Basis von Dimethylaminoboran als Reduktionsmittel und Ni-Acetat oder Ni-Sulfat als zu reduzierendes Metallsalz versetzt. Aus dieser Lösung scheiden nach einer Dauer von ca. 1 min die metallisierten Mikrotubuli aus. Die abgeschiedene Nickelschicht ist bei einer Schichtdicke von rund 10 nm auf den Mikrotubuli geschlossen und zeigt neben elektrischen auch magnetische Eigenschaften. Die Dicke der erzeugten Metallschichten, die bei pH zwischen 6,2 und 7,0 und Temperaturen zwischen 22 °C und 37 °C abgeschieden werden, hängt von der Dauer des Metallisierungsprozesses ab. Es sind neben sehr dünnen Metallschichten (Dicke rund 10 nm) auch Schichten von mehreren 100 nm Schichtdicke auf der Oberfläche der Mikrotubuli realisierbar, wobei die Ausgangsmorphologie der einzelnen Mikrotubuli erhalten bleibt.

Aufgrund dessen, daß die eingesetzten Mikrotubuli einen sehr kleinen Durchmesser von 25 nm besitzen, ist es möglich, metallische Röhren zu erzeugen, die einen Durchmesser von 35 nm bis zu einigen 100 nm besitzen, je nachdem wieviel Metall auf den Mikrotubuli abgeschieden wird. Da die eingesetzten Mikrotubuli in ihrem Durchmesser gleich sind, gibt es zwischen den einzelnen metallisierten Strukturen keine Unterschiede bezüglich deren Durchmesser, was gleiche elektrische und magnetische Eigenschaften zur Folge hat. Des weiteren besitzen die Mikrotubuli eine Länge von mehreren Mikrometer und somit ein großes Aspektverhältnis (Länge : Breite). Dies macht sie für Anwendungen, in denen es auf eine Positionierung und Fixierung der Metallröhren ankommt, besonders geeignet.

Das beschriebene Verfahren der Aktivierung und Metallisierung ist nicht tubulinspezifisch. Es läßt sich auch auf die anderen erfundungsgemäßen Proteinstrukturen anwenden.

Die Aktivierung der Proteine kann nach einer weiteren Ausgestaltung des erfundungsgemäßen Verfahrens auch so erfolgen, daß z. B. nach der Reinigung erhaltene S-Layer der Sporosarcina ureae entweder mit einer K_2PtCl_4 Lösung versetzt werden oder daß die S-Layer zuvor wie bei Pum, D.; Weinhandl, M.; Hödl, C.; Sleytr, U., „Large-Scale recrystallization of the S-Layer of Bacillus coagulans E38-66 at the air/water interface and on lipid films“, J. Bacteriology, May 2762-2766, 1993 beschrieben, an einer Grenzfläche rekristallisieren und anschließend die Subphase der Rekristallisationslösung durch eine K_2PtCl_4 Lösung ersetzt wird. Je nach Dauer der Reaktionszeit kommt es zur Bildung von Pt-Cluster auf der Oberfläche der S-Layer. Vorteilhaft kann in diesem Prozeß der Pt^{2+} -Reduktion zu Pt^0 neben dem im Fall der Aktivierung der Mikrotubuli angegeben reduzierenden Wirkung bestimmter Aminosäuren und der Reduktion des Pt-Salzes durch in der Lösung enthaltende Zusätze wie NaN_3 , die spezifischen Absorption der Pt-Cluster auf Grund der ausgeprägten Ladungsverteilung auf dem S-Layer genutzt werden.

Die so erhaltenen regelmäßigen Anordnungen von Pt-Cluster mit einer Größe von 1 bis 2 nm sind vor allem hinsichtlich der Anwendung der katalytischen Aktivität der abgeschiedenen Cluster interessant. Zudem kann auch wie im Ausführungsbeispiel für die Metallisierung der Mikrotubuli angegeben, durch stromlose Metallisierung ein kontinuierlicher Metallfilm abgeschieden werden.

Anhand nachfolgender Ausführungsbeispiele und beigefügter Abbildungen soll die Erfindung näher erläutert werden. Dabei zeigen:

Abb. 1 REM-Aufnahme metallisierter Mikrotubuli

Abb. 2 TEM-Aufnahme aktiver S-Layer der *Sporosarcina ureae*

Ausführungsbeispiel 1

Beschrieben wird die Herstellung von dreidimensionalen Metallstrukturen auf der Basis von Mikrotubulitemplaten. Zunächst werden die Mikrotubuli wie folgt assembliert:

Die Isolation und Reinigung von Tubulin ist bei *Shelanski, M.; Gaskin, F.; Cantor, C.*, „*Mikrotubule assembly in the absence of added nucleotides*“, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 765-768, 1973 und *Vater, W.; Böhm, K.; Unger, E.*, „*Effects of DNA on the taxo stimulated in vitro assembly of microtubule protein from porcine brain*“, *Studio Biophys.* 97, 47-60, 1983 ausführlich beschrieben. Die Assemblierung von Mikrotubuli aus einer Tubulinpräparation mit einer Konzentration von 1 mg/ml Tubulin erfolgt in einer Pufferlösung von 500 mM MES (2-Morpholinoethansulfonsäure Monohydrat), 1 mM EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-Aminoethyl)-Tetraessigsäure) und 0,5 mM MgCl₂ durch Zugabe von 0,25 mM GTP und 10 µM Taxol bei einer Temperatur von 37 °C. Um die Assemblierung zu verfolgen, wird die Trübung der Assemblierungslösung mit einem Spektrometer bei einer Wellenlänge von 350 nm aufgezeichnet, bis eine Sättigung zu beobachten ist. Danach wird die Lösung bei 14000 Umdrehungen/Minute 30 min zentrifugiert um die assemblierten Mikrotubuli und das nicht assemblierte Protein zu trennen. Der so erhaltene Bodensatz wird wieder in einen MES Buffer bei pH = 6,8 überführt. Die so erhaltene Präparation ist Ausgangspunkt für alle weiteren Aktivierungs- und Metallisierungsschritte.

Ein Volumen von 300 µl dieser Lösung mit den assemblierten Mikrotubuli wird zum Zweck der Aktivierung der Mikrotubuloberfläche mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Palladiumacetatlösung versetzt. Im Aktivierungsprozeß wird diese Lösung stehengelassen, bis eine ausreichende Anzahl von Pd-Keimen auf den Mikrotubuli entstehen (ca. 2 h). Danach

werden die aktivierte Mikrotubuli mit MES-Puffer unter der Verwendung eines 300 kDa Membranfilters zweimal gewaschen. Der erzeugte Rückstand im Membranfilter wird in 500 µl MES-Puffer überführt.

Bei der Untersuchung dieser Probe im Transmissionselektronenmikroskop ist deutlich die Anlagerung von schwarzen Partikeln an der Oberfläche der Mikrotubuli sichtbar. Der Durchmesser der Partikel lag bei 2 Stunden Aktivierung bei rund 2 nm. Hier muß angemerkt werden, daß es für das Beschichtungsverfahren nicht wesentlich ist, ob die angelagerten Palladiumcluster bereits in reduzierter Form oder noch als Pd²⁺-Ionen vorliegen, die dann erst in der Startphase der Metallisierung im Dimethylaminoboranbad reduziert werden. Mit einem energiedispersiven Röntgenmikrobereichsanalysator wurde die Zusammensetzung dieser Cluster bestimmt und festgestellt, daß sie zu 99 % aus Palladium bestehen.

Die so erhaltenen Mikrotubuli mit Pd⁰- bzw. Pd²⁺-Cluster auf der Oberfläche können stromlos beschichtet werden. Hierzu wird ein Nickelbad der folgenden Zusammensetzung verwendet:

50 g/l Ni(CH₃COO)₂·6H₂O

25 g/l Natriumcitrat

25g/l 85%-ige Milchsäure

2,5 g/l Dimethylaminoboran.

Der pH-Wert dieses Metallisierungsbades wird mit NH₄OH auf einen Wert von 6,8 eingestellt.

500 µl der Lösung mit den aktivierte Mikrotubuli werden mit der gleichen Menge des oben beschriebenen Metallisierungsbades versetzt. Nach rund 1 min fallen aus dieser Lösung schwarze Partikel, die die metallisierten Mikrotubuli darstellen, aus. Der weiterlaufende Metallisierungsprozeß läßt sich durch starkes Verdünnen der Lösung mit MES-Puffer abbrechen. Auf diese Weise können Mikrotubuli mit verschiedenen Metallfilmdicken erzeugt werden.

Die nickelmetallisierten Mikrotubuli wurden im Transmissionselektronenmikroskop und Rasterelektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 1 kV untersucht. Eine entsprechende Aufnahme ist in Abb. 1 dargestellt. Die abgeschiedenen Ni-Partikel besitzen

eine Größe von rund 8 - 10 nm, die bei einer Schichtdicke ab 10 nm einen geschlossenen, elektrisch leitenden Film bilden. Ersichtlich ist, daß die Metallisierung nur an mit Pd-Keimen besetzten Stellen der Mikrotubuli beginnt. Das bedeutet, eine Abscheidung von Nickel aus der Metallisierungslösung ist nur nach einer Aktivierung der Mikrotubulioberfläche mit Katalysatorkeimen möglich.

Der magnetische Charakter der Nickelbeschichtung konnte durch Manipulation der metallisierten Mikrotubuli in wässriger Lösung mit Hilfe eines elektromagnetischen Feldes und durch magnetische Rasterkraftmikroskopie nachgewiesen werden.

Ausführungsbeispiel 2

Die Assemblierung der Mikrotubuli und deren Aktivierung wird wie im Beispiel 1 beschrieben durchgeführt. Im Gegensatz zum Beispiel 1 wird Nickel aus einem Nickelsulfatkomplex abgeschieden. Die Zusammensetzung des Metallisierungsbades ist wie folgt:

39,4 g/l NiSO₄·6H₂O
20 g/l Natriumcitrat
10g/l 85%-ige Milchsäure
4g/l Dimethylaminoboran.

Die pH-Wert Einstellung von 6,8 erfolgt ebenfalls mit NH₄OH. Die Abscheideraten dieses Bades liegen in der gleichen Größenordnung wie die des Bades im Beispiel 1, so daß eine Beschichtung von rund 1 min Dauer für die Erzeugung einer kontinuierlichen Ni-Schicht auf den Mikrotubuli ausreicht.

Der magnetische Charakter der Nickelbeschichtung konnte, wie in Ausführungsbeispiel 1 dargelegt, nachgewiesen werden.

Ausführungsbeispiel 3

Die Assemblierung der Mikrotubuli und deren Aktivierung wird wie im Beispiel 1 beschrieben durchgeführt. Im Gegensatz zum Beispiel 1 wird statt Nickel eine Cobaltschicht auf den aktivierte Mikrotubuli abgeschieden. Die Zusammensetzung des Metallisierungsbades ist wie folgt:

25g/l $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

25g/l Bernsteinsäure

4g/l Dimethylaminoboran

Der pH-Wert des Bades wird mit NH_4OH auf 6.8 eingestellt. Die Abscheiderate dieses Bades ist etwas um den Faktor 2 geringer als die Abscheideraten der Ni-Bäder, so daß eine Beschichtungsdauer von rund 2min für die Erzeugung einer kontinuierlichen Co-Schicht auf den Mikrotubuli ausreicht.

Der magnetische Charakter der Cobaltbeschichtung konnte wie in Ausführungsbeispiel 1 dargelegt nachgewiesen werden.

Ausführungsbeispiel 4

Die Assemblierung der Mikrotubuli wird wie im Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

Zum Zweck der Aktivierung der Mikrotubulioberfläche wird ein Volumen von 300 μl assemblierter Mikrotubuli mit einer 3 mM K_2PtCl_4 -Lösung oder einer 3 mM Na_2PdCl_4 -Lösung versetzt. Das Gesamtvolumen der Aktivierungslösung wird auf 1000 μl mit MES-Puffer aufgefüllt. Im Aktivierungsprozeß wird diese Lösung stehengelassen, bis eine ausreichende Anzahl von Pt- bzw. Pd-Keimen auf den Mikrotubuli entstanden sind (ca. 2h). Danach erfolgt die Filtration der aktivierte Mikrotubuli wie im Ausführungsbeispiel 1 angegeben.

Die anschließende Metallisierung wird analog zum Ausführungsbeispiel 1 durchgeführt.

Ausführungsbeispiel 5

Beschrieben wird die Herstellung einer zweidimensionalen regelmäßigen Anordnung von Pt-Cluster auf der Oberfläche des S-Layer Proteins *Sporosarcina ureac*.

Die Isolation und Reinigung des S-Layerproteins ist bei Engelhard H.; Saxton, W.; Baumeister, W., „Three-dimensional structure of the tetragonal surface layer of *Sporosarcina ureaa*“, J. Bacteriology, Oct. 309-317, 1986 ausführlich beschrieben. Die so enthaltenen S-layersheets werden in einer 50mM Phosphatpufferlösung (pH 7,8) mit 1mM MgCl₂ bei 4°C gelagert. Um das Bakterienwachstum in der Proteinlösung zu unterbinden und als zusätzliches Reduktionsmittel für die Aktivierungsreaktion hat sich ein Zusatz von 3mM NaN₃ als hilfreich erwiesen. Diese S-Layer Lösung mit einer Proteinkonzentration von 10mg/ml ist Ausgangspunkt für alle weiteren Aktivierungsschritte.

Ein Volumen von 30 µl dieser Proteinlösung wird mit einer 3mM K₂PtCl₄ Lösung , die ein Tag zuvor angesetzt wurde, versetzt. Das Gesamtvolumen der Aktivierungslösung beträgt 1ml. die Aktivierungslösung wird 24h stehen gelassen bis eine ausreichende Anzahl von Pt-Clustern auf der S-Layer Oberfläche entstanden sind. Danach werden die aktivierten S-Layer mit Phosphatpuffer unter Verwendung eines 300kDa Membranfilters gewaschen. Der erzeugte Rückstand im Membranfilter wird in 500µl Phosphatpuffer überführt.

Zur Untersuchung der Proben werden die aktivierten S-Layer auf einem Transmissionselektronenmikroskop-Grid immobilisiert. Die transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme in Abbildung 2 zeigt deutlich die Ablagerung von Pt-Cluster mit einem mittleren Durchmesser von 1,5 nm. Weiterhin erkennt man deutlich, die periodische Anordnung der Pt-Cluster, die sich an der vielzähligen Symmetrie des S-Layers *Sporosarcina ureae* orientieren. Der mittlere Abstand zwischen den Pt-Cluster von rund 3 nm, läßt den Schluß zu, daß pro Einheitszelle 4 Pt-Cluster abgeschieden wurden. Die chemische Zusammensetzung der abgeschiedenen Cluster wurde mittels einer energiedispersiven Röntgenmikrobereichsanalyse mit 99 % Platin bestimmt.

Patentansprüche:

1. Metallische Nanostruktur, bestehend aus einem metallisierten, selbstassemblierten, geometrisch hochgeordneten Protein.
2. Metallische Nanostruktur nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das selbstassemblierte hochgeordnete Protein teilweise oder vollständig metallisiert ist.
3. Metallische Nanostruktur nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das selbstassemblierte, geometrisch hochgeordnete Protein eine Tubulin enthaltende Struktur oder ein bakterielles Zellhüllenprotein oder ein Kollagen oder ein Actinfilament oder ein DNA-Strang ist.
4. Metallische Nanostruktur nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das selbstassemblierte geometrisch hochgeordnete Protein ein Mikrotubuli ist.
5. Metallische Nanostruktur nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das selbstassemblierte geometrisch hochgeordnete Protein ein S-Layer ist.
6. Metallische Nanostruktur nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das selbstassemblierte geometrisch hochgeordnete Protein ein S-Layer der Sporosarcina ureae ist.
7. Metallische Nanostruktur nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die selbstassemblierten, geometrisch hochgeordneten Proteine mit vollständiger Metallisierung eine Metallisierung aus einer homogenen Metallphase aufweisen, in die Keimbildungszentren eines anderen Metalles eingebettet sind.
8. Metallische Nanostruktur nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die selbstassemblierten, geometrisch hochgeordneten Proteine mit teilweiser Metallisierung eine Metallisierung aus einer Metallphase, in die Keimbildungszentren eines anderen Metalles eingebettet sind, oder Keimbildungszentren eines Metalles aufweisen.

9. Metallische Nanostruktur nach Anspruch 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Keimbildungszentren aus Edelmetallen oder Schwermetallen und die Metallphase aus Kupfer oder Nickel oder Cobalt besteht.
10. Verfahren zur Herstellung metallischer Nanostrukturen auf der Basis selbstassemblierter, geometrisch hochgeordneter Proteine, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine mit einer Metalllösung aktiviert und anschließend stromlos in einem Metallisierungsbad unter für Protein verträglichen Bedingungen metallisiert werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als selbstassemblierte, geometrisch hochgeordnete Proteine Tubulin enthaltende Strukturen oder bakterielle Zellhüllenproteine oder Kollagen oder Actinfilamente oder DNA-Stränge eingesetzt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als selbstassemblierte, geometrisch hochgeordnete Proteine Mikrotubuli oder S-Layer eingesetzt werden.
13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als selbstassemblierte geometrisch hochgeordnete Proteine S-Layer des Sporosarcina ureae eingesetzt werden
14. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die selbstassemblierten geometrisch hochgeordneten Proteine vor der Aktivierung zusätzlich in vitro assembliert werden.
15. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine mit einer Edelmetall- oder Schwermetalllösung aktiviert werden.
16. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine mit einer Palladium- oder Platinsalzlösung aktiviert werden.
17. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine mit einer gesättigten Palladium-Acetatlösung, oder eine K_2PtCl_4 oder eine Na_2PdCl_4 Lösung aktiviert werden.

18. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Metallisierung mit einem Metallisierungsbad auf Basis Dimethylaminoboran als Reduktionsmittel und Nickel- oder Kupfer- oder Cobaltsalzen erfolgt.
19. Verfahren nach Anspruch 10, gekennzeichnet dadurch, daß die Metallisierung mit einem Metallisierungsbad erfolgt, indem Hypophosphit als Reduktionsmittel verwendet wird.
20. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß zur Herstellung metallischer Nanostrukturen mit teilweiser Metallierung die Proteine mit einer Metalllösung aktiviert werden.

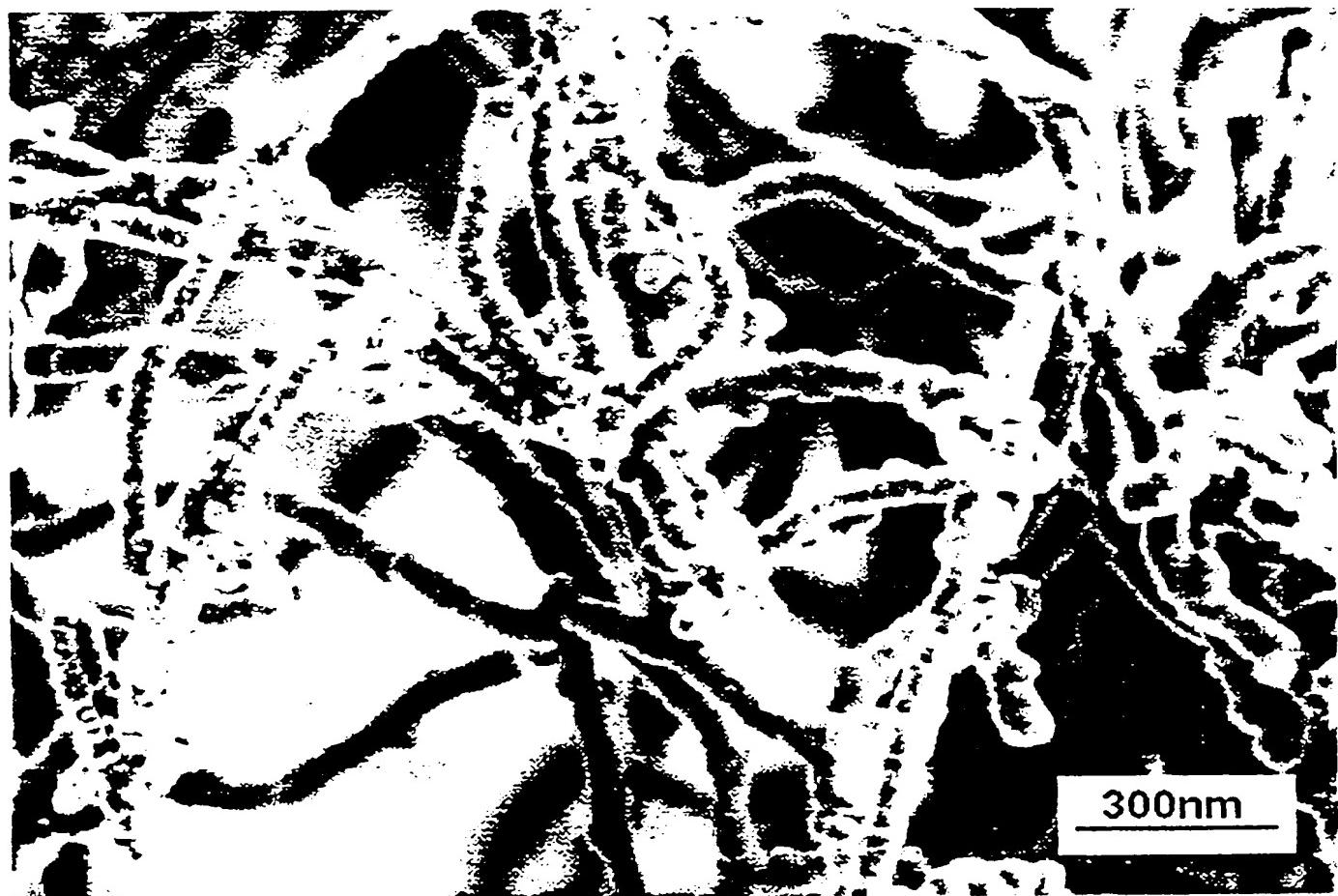


Abbildung 1

2/2

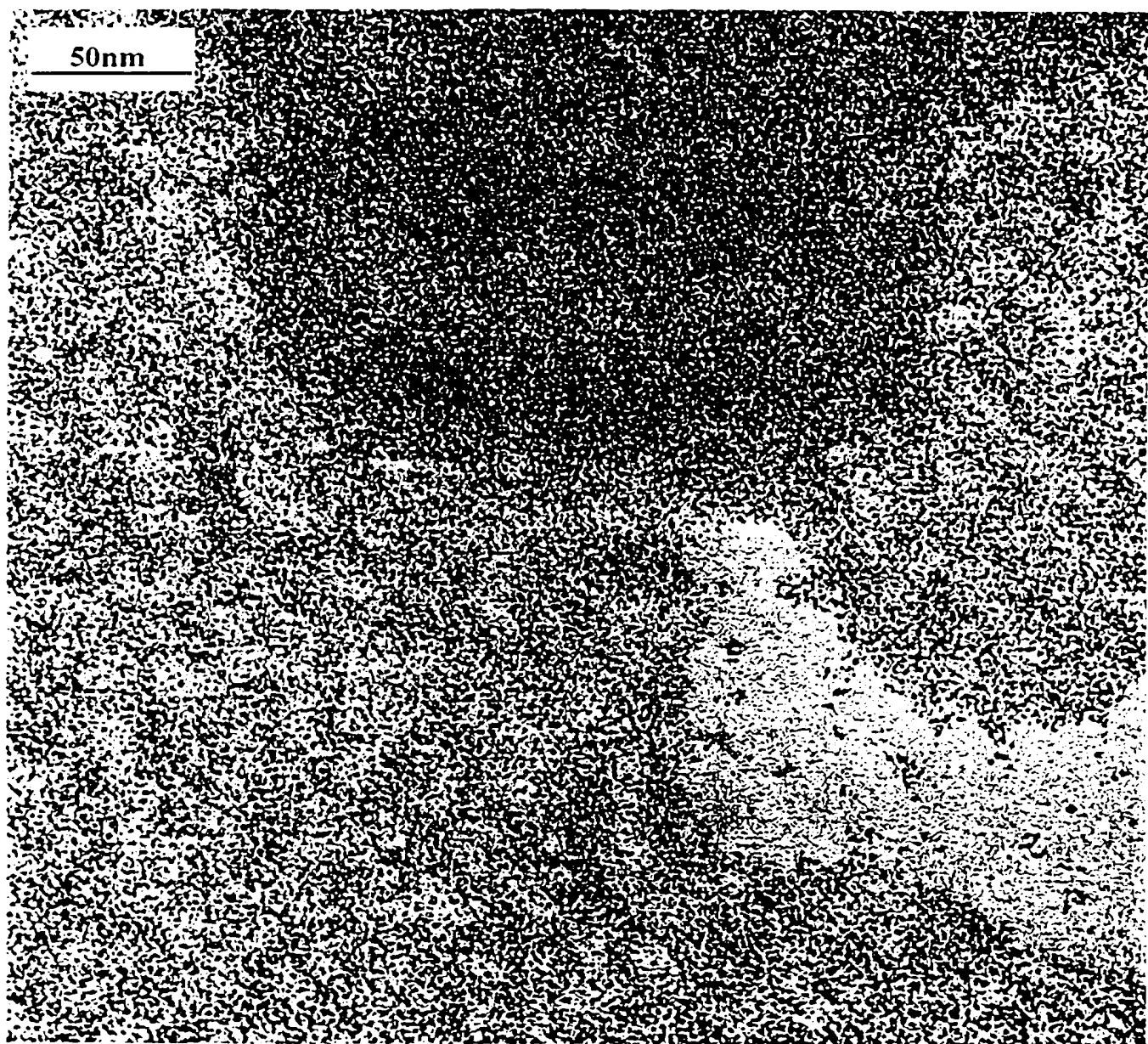


Abbildung 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 97/01236

A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶: C23C 18/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶: C23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	US 4911981 A (SCHNUR et al.), 27 March 1990 (27.03.90) the whole document (mentioned in the description). ---	1-20
A	Chem. abstr., Band 118, № 10, 08 March 1993 (08.03.93) (Columbus, Ohio, USA), page 777, column 2, abstract 9192u, DOUGLAS, K. et al. "Nanostructure fabrication using biomolecular templates", NATO ASI Ser., Ser. C 1992, 374(Phys. Chem. Finite Syst.: Clusters Cryst., Vol 2) 1183-91 (Eng). ---	1-20
A	Chem. abstr., Band 118, № 18, 03 Mai 1993 (03.05.93) (Columbus, Ohio, USA), page 865, column 1, abstract 181227c, DEVAUD, G. et al. "Microstructural modification by fast atom beam milling of nanotextured ultrathin metal films", J. Vac. Sci. Technol., B 1993, 11(1), 32-6 (Eng).	1-20

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 October 1997 (07.10.97)

Date of mailing of the international search report

05 November 1997 (05.11.97)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE
Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 97/01236

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

C 23 C 18/52

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK6

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprässtoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

C 23 C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprässtoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4911981 A (SCHINUR et al.) 27. März 1990 (27.03.90), ganzes Dokument (in der Beschreibung ge- nannt). --	1-20
A	Chem. abstr., Band 118, Nr. 10, 08. März 1993 (Co- lumbus, Ohio, USA), Seite 777, Spalte 2, Zusammen- fassungsnr. 91920u, DOUGLAS, K. et al. "Nanostructure fa- brication using biomolecular templates", NATO ASI Ser., Ser. C 1992, 374 (Phys. Chem. Finite Syst.: Clusters Cryst., Vol 2) 1183-91 (Eng). --	1-20



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *' A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *' E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *' L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *' O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *' P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundliegenden Prinzips oder der ihr zugrundliegenden Theorie angegeben ist
- X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- & Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

07 Oktober 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

05. 11. 97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HU Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

BECK e.h.

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	Chem. abstr., Band 118, Nr. 18, 03. Mai 1993 (Columbus, Ohio, USA), Seite 865, Spalte 1, Zusammenfassungsnr. 181227c, DEVAUD, G. et al. "Microstructural modification by fast atom beam milling of nanotextured ultrathin metal films", J. Vac. Sci. Technol., B 1993, 11(1), 32-6 (Eng). -----	1-20

ANHANG

zum internationalen Recherchenbericht über die internationale Patentanmeldung Nr.

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben. Diese Angaben dienen nur zur Unter-richtung und erfolgen ohne Gewähr.

ANNEX

to the International Search Report to the International Patent Application No.

PCT/DE 97/01236 SAE 165348

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Office is in no way liable for these particulars which are given merely for the purpose of information.

ANNEXE

au rapport de recherche international relatif à la demande de brevet international n°

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents de brevets cités dans le rapport de recherche international visée ci-dessus. Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument Patent document cited in search report Document de brevet cité dans le rapport de recherche	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication	Mitglied(er) der Patentfamilie Patent family member(s) Membre(s) de la famille de brevets	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication
US A 4911981	27-03-90	keine - none - rien	

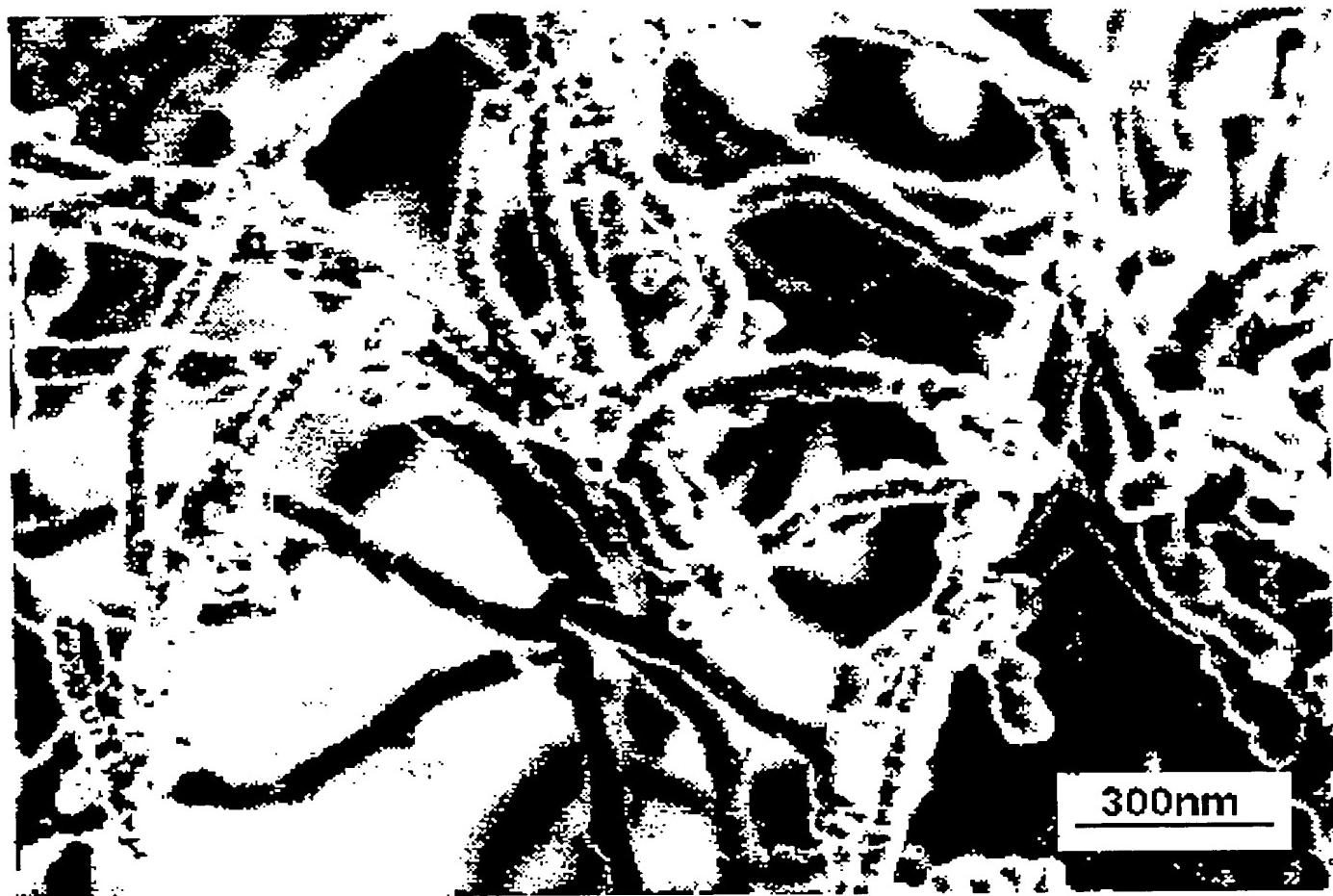


Abbildung 1

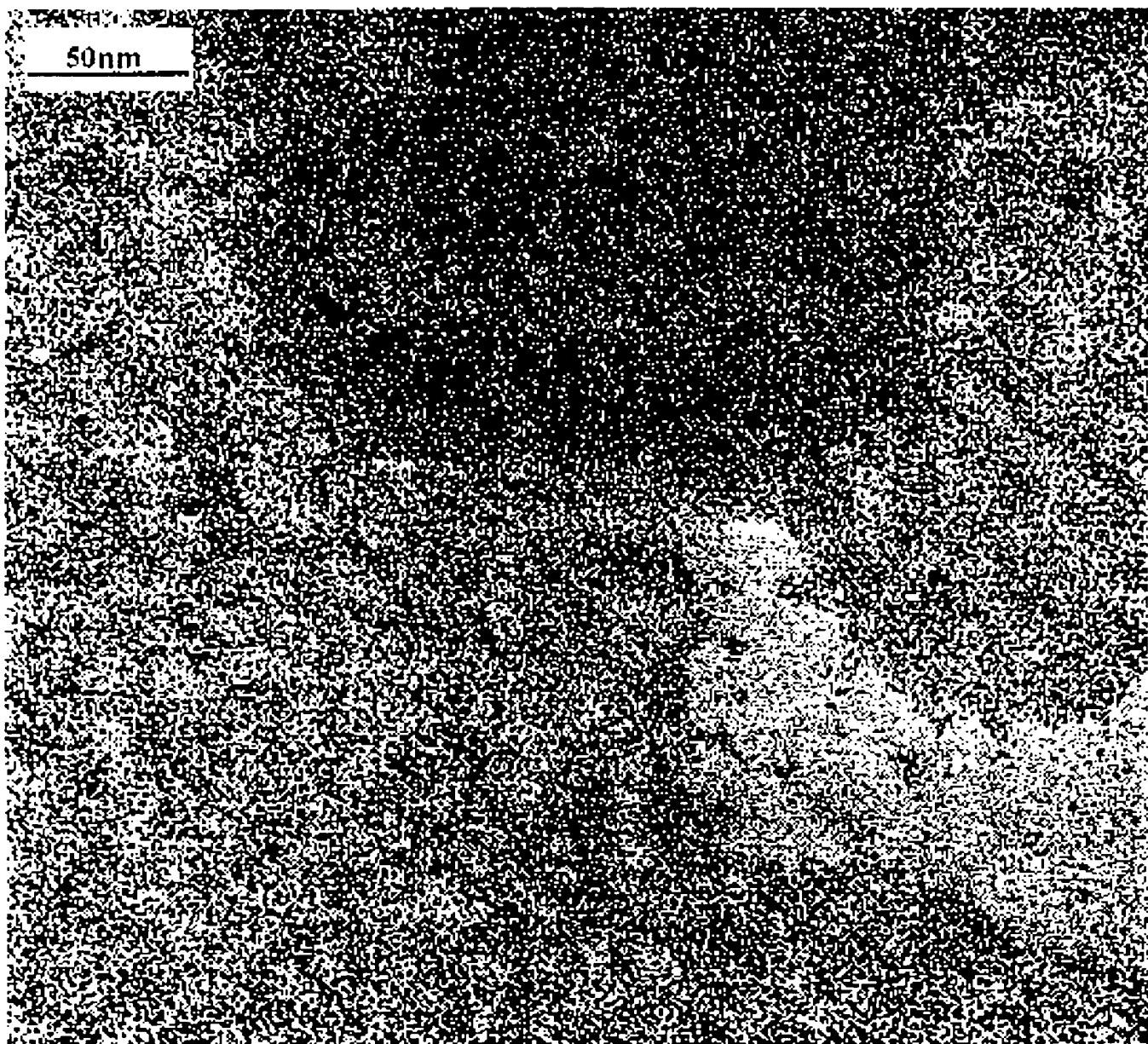


Abbildung 2